

ALTERSABHÄNGIGE AVIDININDUKTION IM WACHTELOVIDUKT

Karin Walter

1981

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Abt. für Angewandte Molekularbiologie

ALTERSABHÄNGIGE AVIDININDUKTION IM
WACHTELOVIDUKT

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Karin Walter
aus Würzburg

Mainz 1980



Dekan: Prof. Dr. med. H. Leithoff

1. Gutachter: Prof. Dr. W.E.G. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. R.K. Zahn

Tag der mündlichen Prüfung: ...20. Mai 1981...

Meinen Eltern

in herzlicher Dankbarkeit gewidmet

Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
cpm	counts per minute
DES	Diäthylstilbestrol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
M	Molar
m-RNS	messenger-Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht-Volumen-Verhältnis
(m)Ci	(milli) Curie

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit erfolgte im Institut für Physiologische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller. Ihm möchte ich für die vielen wertvollen Ratschläge und Hinweise bei der Planung, Durchführung und Interpretation der Versuche, für seine fördernde Kritik und insbesondere für seine geduldige Unterstützung danken, die er mir während der Anfertigung der Arbeit stets gewährte.

Ferner danke ich Frau Maria Schmidt für ihre Hilfe bei der Tierhaltung, Frau Budenz für die statistische Beratung sowie der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsangabe

1. Einleitung
 - 1.1. Avidin
 - 1.2. Östrogen- und Progesteronwirkung am Wachtelovidukt
 - 1.3. Spezielle Zielsetzung
2. Material
3. Methoden
4. Ergebnisse
 - 4.1. Abhängigkeit des Oviduktwachstums von der DES-Vorbehandlung bei Tieren verschiedener Altersklassen
 - 4.1.1. Primäre Stimulierung
 - 4.1.2. Aussetzungsphase
 - 4.1.3. Sekundäre Stimulierung
 - 4.2. Avidin-Induktion durch Progesteron
 - 4.2.1. Abhängigkeit der Avidin-Induktion von der Dauer der DES-Vorbehandlung
 - 4.2.2. Abhängigkeit der Avidin-Induktion von der Zeit nach Progesteronstimulierung
 - 4.2.3. Abhängigkeit der Avidin-Induktion vom Alter
5. Diskussion
6. Zusammenfassung
7. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

In vorliegender Arbeit sollen am biologischen Modell des Wachteloviduktes altersabhängige Unterschiede in der Wirkung von Progesteron und Östrogen aufgezeigt werden mit dem Ziel, durch ein Zurückverfolgen dieser alterskorrelierten Differenzen auf molekulare Ebene weiteren Einblick in die Alternsvorgänge an sich zu gewinnen.

Dazu bedarf es eines Versuchsmodelles, an dem sich spezifische Hormonwirkungen leicht untersuchen lassen. Als solches biologisches Modell bietet sich der Vogelovidukt an, da dieses Organ auf Hormonstimulierung in typischer Weise reagiert: ein spezifisches Hormon, Progesteron, induziert selektiv die Synthese eines spezifischen Proteins, Avidin, welches meßbar ist und somit als Endpunktmarker der Progesteron-Induktionskette (Abb. 6) dienen kann.

1.1. Avidin

Avidin wurde zum ersten Male 1924 als ein Faktor in rohem Hühnereiweiß beschrieben, der auf Ratten toxisch wirkt (4). 1940 gelang es, ihn zu isolieren (9). Wegen seiner großen Affinität zu Biotin nannte man die neugefundene Substanz Avidin. Seine toxische Wirkung beruht darauf, daß die hohe Affinität zu Biotin nach Genuß von rohem Hühnereiweiß zu Biotin-Mangelzuständen führen kann. Eine chemische Charakterisierung dieses Proteins unternahmen 1952 FRAENKEL-CONRAT (10) und GREEN (11, 12). Avidin hat ein Molekulargewicht von 70 000 und ist aus vier einander ähnlichen Ketten zusammengesetzt, von denen jede ein Biotin-Molekül irreversibel binden kann. Seine Synthese im Vogelovidukt läßt sich nach vorheriger Östrogen-Stimulierung durch Progesteron induzieren.

1.2. Östrogen- und Progesteronwirkung

Als endokrines Zielorgan von Östrogen und Progesteron ist der Vogelovidukt in besonderem Maße zur Untersuchung der Hormonwirkung geeignet, da hier ein spezifisches Protein, Avidin, existiert, an dem sich die selektive Wirkung von Progesteron verfolgen läßt.

Die einzelnen funktionellen Segmente des Vogeloviduktes sind in Abb. 1 dargestellt:

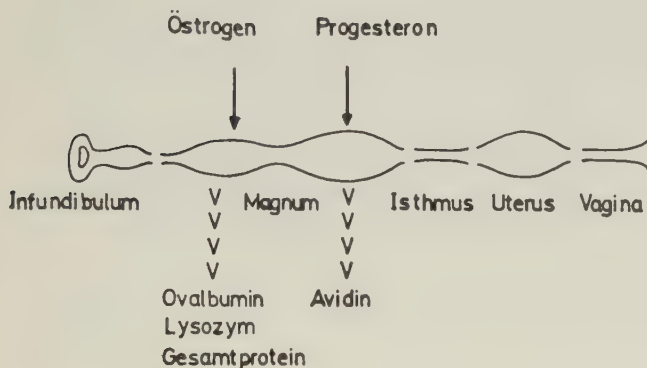


Abb. 1: Funktionelle Segmente des Wachteloviduktes (40).

Dem Magnum-Anteil gilt als Ort spezifischer Syntheseleistung besonderes Interesse. Synthetische Östrogene wie Diäthylstilbestrol (DES) üben hier dieselbe physiologische Wirkung aus wie die natürlichen Hormone. Im Oviduktgewebe unreifer Wachteln findet nach DES-Gabe eine Stimulierung der Aktivität der DNS-Polymerase (24) und somit ein Ingangsetzen der Zellproliferation statt, deren Ausmaß sich an einem deutlichen Gewichtanstieg der Ovidukte verfolgen läßt.

Dabei differenzieren sich aus den gleichförmigen primitiven Epithelzellen der Ovidukt-Mucosa drei morphologisch unterscheidbare Zelltypen: Flimmerepithel, kelchförmiges Epithel und tubuläre Drüsenzellen (41, 18). Gleichzeitig kommt es zu einer Genaktivierung und einer Stimulierung derjenigen Enzyme, die zur Synthese von m-RNS benötigt werden. In der Folge nimmt neben dem Oviduktgewicht der Gehalt an Ovalbumin, Lysozym und an Gesamtprotein als Ausdruck einer östrogen-spezifischen Syntheseleistung zu (41).

Im Ovidukt von Wachteln, deren Organismus durch endogenes oder exogenes Östrogen stimuliert ist, wird durch Progesteron in den Kelchzellen die Synthese von Avidin in Gang gesetzt. Ohne Progesteron läßt sich kein Avidin nachweisen (17, 39). Die beobachtete Avidin-Induktion ist für Progesteron spezifisch, d.h. andere Proteine werden nicht induziert (17, 37, 39). Bekannt ist, daß die Synthese der m-RNS und die Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase als Ausdruck der Proteininduktion ansteigen (24).

Östrogen-spezifische Syntheseleistungen werden durch Progesteron gehemmt, wenn das Hormon nach oder gleichzeitig mit Östrogen gegeben wird. Dies geschieht über eine Hemmung der Proliferation und Ausdifferenzierung der tubulären Drüsenzellen, in denen sich die östrogen-gesteuerte Proteinsynthese vollzieht, vermutlich aber auch durch eine Hemmung von östrogen-induzierter m-RNS und Peptiden (20). Sind die tubulären Drüsenzellen jedoch schon ausgebildet, kann Progesteron in ihnen in Abwesenheit von Östrogen die Proteinsynthese sogar fördern und damit eine synergistische Wirkung zu Östrogen entfalten (36).

1.3. Spezielle Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, mit dem Aufzeigen altersabhängiger Unterschiede in der Wirkung von Östrogen und insbesondere Progesteron auf den Wachtelovidukt ein biologisches Modell zu etablieren, in dem sich einfach und übersichtlich altersabhängige Veränderungen auf molekularer Ebene untersuchen lassen, um damit der Lösung der Frage nach den Alternsvorgängen in der Zelle näher zu kommen.

2. Material

Fertig bezogene Reagentien und Präparate:

Diäthylstilbestrol, Progesteron, Avidin und Bentonit
(Fa. Serva, Heidelberg)

D-Biotin-(carbonyl-C 14): spez. Aktivität 46 mCi/mmol,
187 μ Ci/mg.

(The Radiochemical Centre, Amersham, England)

Sesamöl

(Caesar u. Loretz, Holden)

Nitrozellulose-Filter HAWP, 0,45 μ m
(Millipore Corporation, Neu-Isenburg)

Alle Chemikalien wurden in p.a. Qualität verwendet.

Weibliche Japan-Wachteln (*Coturnix japonica*) wurden von
J. Bökamp, Schloß Holte, bezogen.

Folgende vier verschieden alte, bzw. unterschiedlich gehaltene Wachtelkollektive wurden untersucht:

- nicht geschlechtsreife Wachteln mit einem Durchschnittsgewicht von 100 g (Alter etwa 35 Tage) = unentwickelte Tiere.
- geschlechtsreife, eierlegende Wachteln mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g (Alter etwa 300 Tage) = reife, eierlegende Tiere.
- geschlechtsreife, nicht eierlegende Wachteln mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g (Alter etwa 300 Tage) = reife, nicht eierlegende Tiere.
- nicht eierlegende Wachteln mit einem Durchschnittsgewicht von 170 g (Alter etwa 730 Tage) = alte, nicht eierlegende Tiere.

Die Wachteln der Kollektive I, II und IV wurden mit Kükenalleinfutter (Deuka all-mash-A) von der Deutschen Kraftfutter GmbH (B.J. Stolp), Worms oder mit Geflügelmast-Alleinfutter von Te-Wa-Kraftfutterwerk Warendorf/Westfalen aufgezogen.

Das Kollektiv III wurde in den ersten 250 Tagen wie die anderen gefüttert, anschließend aber auf Weizen umgestellt. 20 Tage danach stellten die Tiere das Eierlegen ein.

Bei der Zentrifugation der Proben wurden Umdrehungszahlen bis 14 000 Upm mit einer Sorvall superspeed RC 2-B erreicht, höhere Drehzahlen mit einer Spinco L 2 - 50 B mit einem SW 40 Rotor.

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mit einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillations Spectrometer, Modell 3380/544.

3. Methoden

Zur Stimulierung der Ovidukte erhielten die Wachteln in die Wade subkutane Injektionen von 5 mg Diäthylstilbestrol (gelöst in 0,25 ml Sesamöl) pro Tag und/oder von 5 mg Progesteron (gelöst in 0,25 ml Sesamöl).

Zum angeführten Zeitpunkt wurden die Tiere nach Chloroformierung dekapitiert. Die Ovidukte wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung nach maximal 30 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung bei 0-4°C aufbewahrt.

Avidin-Bestimmung

Die Bestimmung des Avidin-Gehaltes wurde in Anlehnung an KORENMANN et al. (16) und O'MALLEY (39) durchgeführt. Der Magnum-Teil von Ovidukten wurde isoliert und in einem Verhältnis von 1 : 10 (w/v) mit einem Phosphat-Puffer (s.u.) in einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen) bei Stellung 6,5 für 2 min. bei 2°C homogenisiert.

Phosphat-Puffer: (pH 7,1)	0,07	M KCl
	0,07	M NaCl
	0,004	M MgCl ₂
	0,20	M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄

Das Homogenat wurde zunächst 2 min. lang bei 10 000 Upm und 0°C vorzentrifugiert, danach der Überstand 60 min. lang bei 40 000 Upm und 0°C in einer Spinco L 2 - 50 B mit einem SW 40 Rotor ultrazentrifugiert. Der gewonnene klare Überstand wurde bis zum Avidin-Test bei -20°C eingefroren.

Die Reaktionslösung für die Avidin-Bestimmung enthielt neben der Avidin-Eichlösung bzw. -Probe (0,1 - 1,0 ug/0,6 ml im Reaktionsansatz) 100 ul ¹⁴C-Biotin (100 000 cpm) und wurde mit 0,2 M Ammonium-Carbonat auf ein Endvolumen von 0,6 ml aufgefüllt.

Der Reaktionsansatz wurde bei einer Temperatur von 23°C 10 min. lang inkubiert. Anschließend wurde jeder Probe 1 ml einer Bentonit-Suspension (10 mg Bentonit in 1 ml Ammonium-Carbonat) zugegeben. Nach 5 min. wurden die Proben unter leichtem Sog durch Nitrozellulose-Filter gefiltert. Der Bentonit-Avidin-Komplex blieb dabei auf dem Filter zurück. Ungebundenes ^{14}C -Biotin wurde durch Nachwaschen mit 10 ml 0,2 m Ammonium-Carbonat von den Filtern entfernt. Nach Trocknen der Filterscheibchen wurden diese in 1 ml Methoxyäthanol gelöst und in 10 ml Dioxan-Scintillator (s.u.) in einem Scintillations-Zähler gemessen. Die Meßzeit betrug 5 min. pro Probe.

Dioxan-Scintillator:

60	g	Naphtalin
100	ml	Methanol
20	ml	Äthylenglycol
4	g	PFO (2,5-Diphenyloxazol)
0,2	g	PO-POP (Dimethyl-POPOP = 1,4-bis-2-(4 Methyl-5-Phenyloxazolyl)-benzol)
		Dioxan ad 1000 ml

Die Eichkurve für Avidin ist unter diesen Bedingungen zwischen 0,1 und 1,0 µg pro Testansatz linear (Abb. 2).

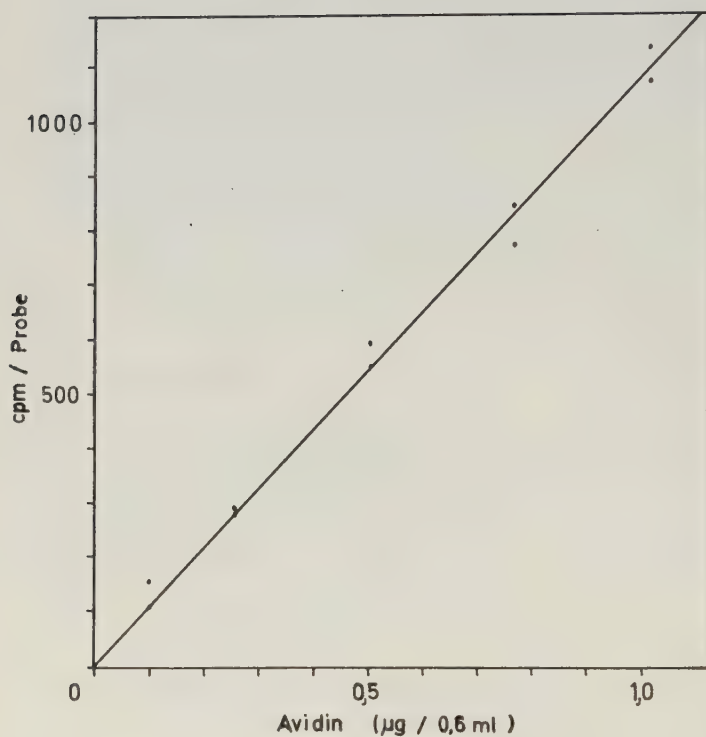


Abb. 2: Bestimmung von Avidin durch Bindung an ^{14}C -Biotin
(Eichkurve)

x-Achse: Avidin-Konzentration ($\mu\text{g}/0,6$ ml Reaktions-
ansatz);

y-Achse: korrespondierende Radioaktivität des Bentonit-
Avidin- ^{14}C -Biotin-Komplexes

4. Ergebnisse

4.1. Abhängigkeit des Oviduktwachstums von der DES-Vorbehandlung bei jungen und alten Wachteln

4.1.1. Die synthetische Substanz Diäthylstilbestrol (DES) besitzt bei Vögeln die gleiche physiologische Wirkung wie die Östrogenhormone (21, 41). Nach einer 5-tägigen Gabe von DES steigt das Gewicht der Ovidukte unreifer Wachteln von durchschnittlich 0,1 auf 1,3 g an. In ähnlicher Weise nimmt auch das Oviduktgewicht alter, nicht mehr eierlegender Tiere nach DES-Stimulierung zu (Abb. 3).

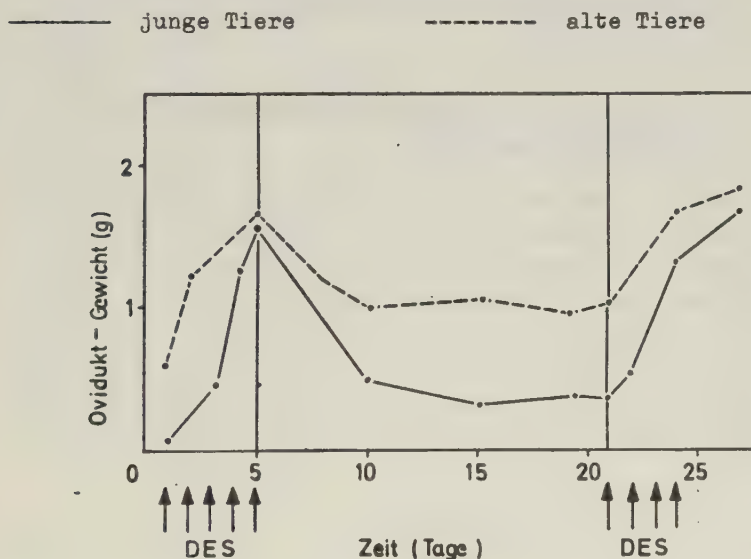


Abb. 3: Abhängigkeit des Oviduktgewichtes von der Dauer der DES-Gabe bei unreifen und alten Tieren. Die Wachteln wurden für 5 Tage mit DES behandelt (primäre Stimulation), anschließend wurde für 16 Tage die DES-Gabe unterbrochen. Danach wurde DES wieder 4 Tage lang gegeben (sekundäre Stimulierung). Es wurden jeweils 25 Ovidukte von unstimulierten und 5 Ovidukte von DES-behandelten Tieren für die Bestimmung herangezogen. Die Mittelwerte sind angegeben; die Standardabweichung ist geringer als 15 %.

4.1.2. Nach Aussetzen der DES-Stimulierung kommt es zu einer raschen Abnahme des Oviduktgewichtes in beiden Kollektiven, wobei der Rückgang bei den alten Tieren weniger dramatisch verläuft (Abb. 3).

4.1.3. Erneute DES-Gabe (sekundäre Stimulierung) führt in beiden Tiergruppen zu einem neuerlichen Anstieg des Oviduktgewichtes, der im Vergleich zur primären Stimulierung wesentlich rascher vonstatten geht.

4.2. Avidin-Induktion durch Progesteron

4.2.1. Abhängigkeit der Avidin-Induktion von der Dauer der DES-Vorbehandlung

Junge, unreife Wachteln wurden verschieden lange mit DES behandelt und erhielten dann eine einmalige Dosis von Progesteron. In Tieren, die nicht durch Östrogen stimuliert wurden, bewirkt eine Progesteron-Gabe keine Avidin-Induktion. Eine maximale Synthese ist nach einer 5-tägigen Stimulierung mit DES und anschließender Injektion von Progesteron festzustellen (Abb. 4). Länger dauernde DES-Vorbehandlung führt zu einer Abnahme des Avidingehaltes pro g Ovidukt.

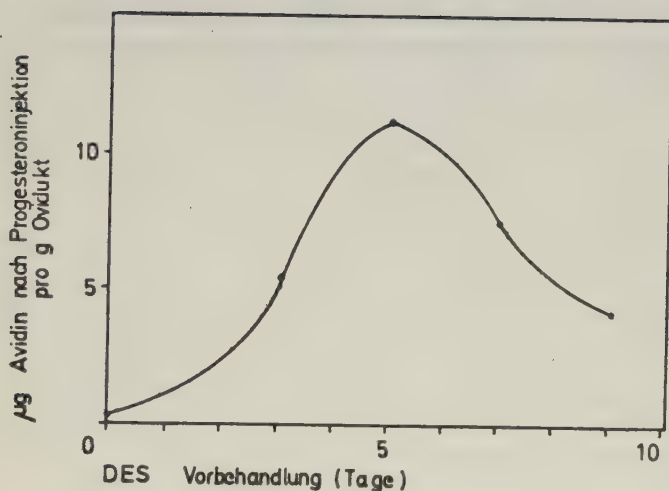


Abb. 4: Abhängigkeit der Avidin-Induktion von der Dauer der DES-Stimulierung bei unreifen Tieren. Die Tiere wurden verschieden lang (Angabe auf der x-Achse) mit DES vorbehandelt und anschließend 1 x mit Progesteron gespritzt. 48 Std. nach der Progesteron-Gabe wurden die Ovidukte entnommen und der Avidin-Gehalt pro g Ovidukt bestimmt (Angabe auf der y-Achse). Es sind die Mittelwerte von je 3 Tieren angegeben. Die Standardabweichung ist geringer als 20 %.

4.2.2. Abhängigkeit der Avidin-Induktion vom Zeitpunkt der Progesteron-Stimulierung

Bei unreifen Wachteln, die 5 Tage lang mit DES behandelt wurden, bewirkt eine einmalige Gabe von Progesteron innerhalb der folgenden zwei Tage einen kontinuierlichen Anstieg der Avidin-Konzentration im Ovidukt. Ein Maximum ist nach 48 Stunden erreicht. Nach 96 Stunden ist der Avidin-Gehalt wieder auf nahezu Null zurückgegangen (Abb. 5).

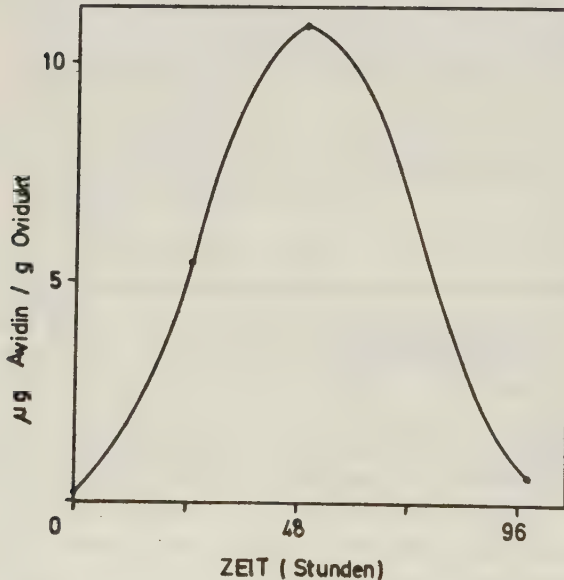


Abb. 5: Konzentration des Avidin pro g Ovidukt in DES-stimulierten Wachteln (DES-Vorbehandlung von 5 Tagen) nach einer einmaligen Gabe von Progesteron. Es sind die Mittelwerte von je 3 Tieren angegeben. Standardabweichung geringer als 20 %.

4.2.3. Abhängigkeit der Avidin-Induktion vom Alter

Die Ergebnisse in Tab. 1 zeigen zusammengefaßt das Ausmaß der Progesteron-induzierten Avidin-Synthese bei Wachteln, deren Ovidukte sich in verschiedenen physiologischen Funktionszuständen befanden.

Tierkollektiv	DES-Stimulierung (in Tagen)	Progesteron-Gabe (in Tagen)	Avidin-Gehalt ($\mu\text{g/g}$ Ovidukt)
Unentwickelte	0	1	$< 0,15$
Tiere	3	1	$5,3 \pm 1,3$
	5	1	$11,5 \pm 2,5$
reife, eier-	0	0	$12,7 \pm 2,3$
legende Tiere		1	$12,4 \pm 2,4$
	3	0	$12,1 \pm 2,2$
		1	$11,5 \pm 2,4$
Reife, nicht	0	0	$< 0,15$
eierlegende Tiere		1	$0,3 \pm 0,1$
	3	0	$2,1 \pm 0,6$
		1	$12,9 \pm 2,4$
Alte, nicht mehr	0	0	$< 0,15$
eierlegende Tiere		1	$< 0,15$
	3	0	$2,6 \pm 0,9$
		1	$2,9 \pm 0,8$

Tab. 1: Abhängigkeit der Avidin-Induktion vom Alter und damit vom physiologischen Zustand der Tiere. Die Tiere wurden, wie in der Tabelle angegeben, mit DES stimuliert. Progesteron wurde, wenn verabreicht, 48 Std. vor der Dekapitierung gegeben. Es sind die Mittelwerte des Avidin-Gehaltes mit Standardabweichung von je 5 Tieren angegeben.

5. Diskussion

Die physiologischen Vorgänge der hormonbedingten Ausdifferenzierung von Reproduktionsgewebe während der Geschlechtsreife lassen sich im Wachtelovidukt durch Zufuhr künstlicher Hormone imitieren: Nach Gabe des synthetischen Östrogens Diäthylstilbestrol (DES) findet im Oviduktgewebe unreifer Wachteln eine Zellproliferation statt, deren Ausmaß sich an einem deutlichen Gewichtsanstieg der Ovidukte (Abb.3) verfolgen läßt. Diese Gewichtszunahme während der primären Hormonstimulation wird zum einen verursacht durch eine dramatische Zellproliferation, zum anderen durch eine Vergrößerung der Zellvolumina aufgrund einer intensiven intrazellulären RNS- und Protein-Biosynthese (24).

Nach Aussetzen der DES-Gabe kommt es bei jungen und alten Tieren zu einer raschen Abnahme des Oviduktgewichtes. (Abb.3) Diese wird hervorgerufen durch Involution des Gewebes und ist begleitet von einem Funktionsstop der zellulären Syntheseleistungen: Sowohl die Protein- als auch die DNS- und RNS-Synthese werden entweder völlig eingestellt oder drastisch reduziert. Es kommt jedoch zu keiner Entdifferenzierung bereits ausgebildeter Zellen im Ovidukt (36, 41).

Die Phase des raschen Gewichtsanstieges bei Tieren aller Altersklassen nach sekundärer Stimulierung ist gekennzeichnet durch eine schnelle Wiederherstellung der physiologischen Funktionen und bei jungen Tieren auch durch weitere Zellproliferation (36).

Bei alten Wachteln dagegen wird die Zunahme des Oviduktgewichtes während der primären und sekundären DES-Stimulierung nicht durch eine Vermehrung der Zellzahl im Ovidukt hervorgerufen. Sie geht vielmehr auf eine Aktivierung der Stoffwechselvorgänge in bereits ausgebildeten Oviduktzellen zurück, die zu einer Vergrößerung der Zellvolumina führt (24).

Nur in Östrogen-stimulierten unreifen Tieren ruft die einmalige Zufuhr einer Dosis Progesteron als exogenes Stimulationssignal eine definierte und meßbare Antwort hervor, nämlich die Bildung von Avidin. In Tieren, die kein DES erhielten und nicht über körpereigene Östrogene verfügen, bewirkt Progesteron keine Avidininduktion. Erst an den Kelchzellen, die sich durch Östrogen aus undifferenziierten Epithelzellen bilden, kann Progesteron seine hormonelle Wirkung entfalten, d.h. in diesen Zellen Avidin induzieren (41). Bei den Dosen, die in vorliegenden Versuchen angewandt wurden, ist in Jungtieren nach fünftägiger DES-Behandlung eine maximale Avidin-Synthese feststellbar. Eine längere DES-Stimulierung führt zu einer Abnahme der Avidin-Konzentration im Ovidukt. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Zunahme der tubulären Drüsenzellen, die Lysozym und Ovalbumin synthetisieren, verbunden mit einer relativen Abnahme der Avidin-produzierenden Kelchzellen (35).

Der Anstieg der Avidin-Konzentration im Ovidukt erfolgt nach Gabe von Progesteron innerhalb von 48 Stunden und ist nach weiteren 48 Stunden wieder auf nahezu Null zurückgegangen. Da weibliche Wachteln physiologischerweise in Abhängigkeit vom Alter körpereigene Hormone produzieren, ist die Progesteronwirkung bei nicht DES-vorbehandelten Tieren abhängig vom jeweiligen Funktionsstand des Organismus. Nur reife, eierlegende Tiere enthalten im Ovidukt schon vor DES- und Progesterongabe Avidin, das sich durch Progesteron nicht mehr steigern läßt. Alle anderen Tierkollektive, d.h. sowohl unentwickelte als auch reife und alte nicht mehr eierlegende Wachteln zeigen ohne Vorbehandlung weniger als 0,15 µg Avidin pro g Ovidukt.

Bei reifen, eierlegenden Tieren hat sich die Ausdifferenzierung der Kelchzellen unter Einwirkung der natürlichen Östrogene vollzogen. Da auch die Avidin-Synthese durch körpereigenes Progesteron bereits induziert ist, führt exogenes Progesteron bei diesen Tieren zu keinem weiteren Anstieg des Avidin-Gehaltes.

Bei reifen, nicht eierlegenden Tieren bedarf es einer dreitägigen Vorbehandlung mit DES, bis der Avidin-Gehalt im Ovidukt nach einer einmaligen Progesterongabe dem der reifen eierlegenden Wachteln entspricht. Der Funktionsstop der zellulären Syntheseleistung wurde durch die sekundäre Stimulierung wieder aufgehoben.

Unentwickelte Tiere erreichen erst nach fünftägiger DES-Stimulierung und darauffolgender Progesterongabe Avidinwerte, die denen der reifen Tiere entsprechen. Nach nur dreitägiger Östrogengabe kommen sie nur auf 43 % des Wertes reifer Wachteln. Als Ursache hierfür ist das Fehlen von Avidin-produzierenden Kelchzellen anzunehmen, deren Bildung erst durch DES eingeleitet werden muß.

Alte, nicht mehr eierlegende Tiere zeigen auch nach dreimaliger DES- und anschließender Progesterongabe nur 24 % des Avidingehaltes von Ovidukten reifer Wachteln (Tab. 1). Bei alten Tieren ist also die Induzierbarkeit der Avidinsynthese durch Progesteron deutlich herabgesetzt. Auch nach vorausgegangener DES-Stimulierung nimmt das Ovidukt die Avidin-Synthese nur in sehr geringem Umfang wieder auf, so daß eine teilweise irreversible Aufhebung zumindestens dieser spezifischen Syntheseleistung bei alten Tieren angenommen werden kann.

Über den Wirkungsmechanismus des Progesterons ist bekannt, daß es in östrogen-stimulierten Tieren Veränderungen der "rapidly labeled RNS"-Synthese im Zellkern sowie eine Aktivitätssteigerung der RNS-Polymerase hervorruft (22, 40). Die Transskriptionskapazität des Chromatin-Templates wird erhöht (41, 42). Da dies kurz vor Auftreten des einzigen durch Progesteron stimulierten Proteins, nämlich Avidin, stattfindet, liegt die Annahme nahe, daß die Induktion dieses spezifischen Proteins durch Progesteron auf der Ebene der Transskription abläuft, indem die Synthese neuer m-RNS induziert wird, die sekundär die Synthese von Avidin bewirkt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß die Avidin-

synthese zwar nicht durch DNS- und Mitosehemmstoffe, wohl aber durch Inhibitoren der Protein- und RNS-Synthese gehemmt wird, insbesondere durch Actinomycin D, das auch in solchen Dosen hemmend wirkt, welche die RNS-Neubildung, nicht aber die Proteinsynthese beeinflussen (40).

Wie gezeigt werden konnte, hängt die Progesteronwirkung auf die in vivo-Avidinsynthese vom Differenzierungszustand des Wachteloviduktes ab. In alten, nicht mehr eierlegenden Tieren läßt sich im Gegensatz zu jungen und reifen Tieren die Avidin-Synthese nur noch in sehr geringem Ausmaße induzieren (Tab. 1). Die Ergebnisse sprechen dafür, daß auch diese altersabhängig verminderte Induzierbarkeit auf Veränderungen auf der Transskriptionsebene zurückzuführen sind. Vermutungen über den möglichen Wirkungsmechanismus können zunächst nur hypothetisch sein: Abnahme der Anzahl bestimmter Gene im Alter, zunehmende Stückverluste repetitiver DNS, wodurch die fortlaufende Codierung der m-RNS im Operatorbezirk nicht mehr gegeben ist (13), irreversible Funktion eines hypothetischen Gen-Repressors durch Vernetzungsvorgänge.

Schon früher wurden biologische Modelle zur Erforschung hormoninduzierter Genaktivierung erstellt (1, 2). Der Nachteil dieser Modelle lag darin, daß in ihnen häufig nur altersabhängig unterschiedliche Enzymmengen und -aktivitäten gemessen wurden, die alleine nur wenig Aufschluß über die molekularbiologische Ursache dieser Unterschiedlichkeiten gewähren.

Die Bedeutung vorliegender Versuche liegt vor allem darin, daß es mit dem biologischen Modell des Wachteloviduktes möglich wurde, alternsabhängige hormoninduzierte Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene zu verfolgen. Da einerseits der Wirkungsmechanismus von Progesteron auf molekularer Ebene bekannt ist und wir andererseits in vorliegendem Modell die Möglichkeit haben, die spezifische Induktionwirkung von Progesteron an Avidin als Endglied der

Progesteron-Induktionskette quantitativ zu verfolgen, lassen sich hiermit die gefundenen altersabhängigen Unterschiede der Hormonwirkung auf molekularbiologische Ebene zurückführen.

Es existieren isolierte Tests, mit denen nahezu alle Glieder der Progesteron-Induktionskette (Abb. 6) quantitativ untersucht werden können (24):

Permeabilität der Zellmembran für Progesteron-Moleküle (44),
Bindungskapazität des zytoplasmatischen Hormonrezeptors für Progesteron (44),

Bindungskapazität des nukleären Hormonrezeptors für Progesteron (42),

Bindungskapazität des Chromatins mit dem Progesteron-Rezeptor-Komplex (46),

Aktivität der RNS-Polymerasen (7) und Poly (ADP-Rib) Polymerase (22),

Modifikation der RNS-Polymerase (31),

Änderung der Affinität zwischen der RNS-Polymerase II und dem Chromatin (8),

Synthese und Abbau von poly-(A)Sequenzen an der heterogenen RNS (26),

Regulationsfaktoren am Polysom-Komplex (6) und

Bestimmung der Protein-Syntheserate im intakten Zellsystem (43).

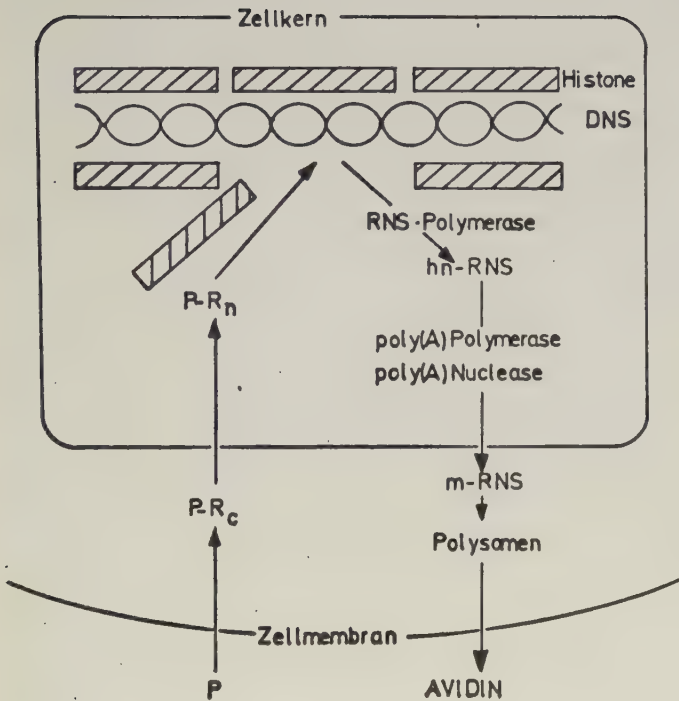


Abb. 6: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Wirkungsweise von Progesteron (P) auf die betreffenden Zellen im Wachtelovidukt (nach MÜLLER et al., 1975)

$P-R_n$ = nucleärer Progesteron-Rezeptor

$P-R_c$ = cytoplasmatischer Progesteron-Rezeptor

Basierend auf dem hier vorgestellten Modell des Wachteloviduktes wurden in der Folge zahlreiche dieser Schritte der Induktionskette auf altersabhängige Unterschiede hin untersucht.

So konnte nachgewiesen werden, daß die Zusammensetzung des Chromatins sich in Abhängigkeit vom Alter des untersuchten Organismus ändert und die Bindungsfestigkeit der Kernproteine an die DNS im Chromatinkomplex zunimmt (24). Aus der Tatsache, daß die Template-Aktivität der DNS im Chromatinkomplex für eine exogene RNS-Polymerase bei alten Tieren deutlich gegenüber jungen reduziert ist, entwickelte sich als Grundlage für weitere gerontologische Forschungen die Vorstellung, daß Alternsvorgänge auch "epigenetisch" programmiert sind. Es konnten weiter altersabhängige Unterschiede auch während der Replikationsphase des Zellzyklus in der Aktivität der DNS-Polymerasen α und β und auf der Transskriptionsebene in der Aktivität der RNS-Polymerasen nachgewiesen werden (5, 27, 28). Erstmals überhaupt wurden an dem Wachteloviduktmodell Untersuchungen auf dem Post-Transskriptionsniveau durchgeführt. Darin konnte nach umfangreichen Vorversuchen (3, 26, 29 - 34, 47) aufgezeigt werden, daß die poly-(A)Sequenz der m-RNS in alten Tieren im Vergleich zu der reifer Tiere aufgrund der erhöhten Aktivität des katabolen Enzyms poly-(A)Exoribonuclease kürzer ist (48), was zu einer reduzierten Translationskapazität führt (45). Eine wesentliche Ursache der altersabhängig verminderten Genrealisationsfähigkeit ist danach auf dem Post-Transskriptionsniveau zu suchen, was für weitere Forschungen auf dem Gebiet der molekularen Gerontologie von Bedeutung sein kann. Für den überwiegenden Teil dieser vorgenannten Untersuchungen stellte der Wachtelovidukt das Arbeitsmodell zur Aufzeigung der altersabhängigen Unterschiede dar, so daß durch vorliegende Arbeit ein Grundstein für weiterführende Studien auf dem Gebiet der molekularbiologischen Alternsforschung in den letzten Jahren gelegt wurde.

6. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit werden am Versuchsmodell des Wachteloviduktes altersabhängige Unterschiede in der Wirkung von Östrogen und Progesteron untersucht.

Auf Gabe des synthetischen Östrogen DES reagieren Tiere verschiedenen Alters mit einem Anstieg des Oviduktgewichtes, was bei jungen Wachteln vor allem auf eine Zellproliferation, bei alten auf eine Vergrößerung der Zellvolumina durch aktivierte Stoffwechselvorgänge durch verstärkte Proteinbiosynthese zurückzuführen ist. In DES-vorbehandelten jungen Wachteln ruft eine einmalige Dosis von Progesteron 48 Stunden nach Verabreichung die Synthese des Proteins Avidin hervor. Nur in reifen eierlegenden Tieren ist schon vor DES- und Progesterongabe Avidin nachweisbar. In allen anderen Altersklassen ist dessen Synthese von einer DES-Vorbehandlung abhängig. In alten Tieren allerdings läßt sich trotz dieser Vorbehandlung eine verminderte Induzierbarkeit von Avidin aufzeigen.

Diese altersabhängig unterschiedliche Induktionsfähigkeit läßt sich am Wachtelovidukt aufgrund des bekannten molekularen Wirkungsmechanismus von Progesteron auf die Transkriptionsebene zurückführen. Mit dem Wachtelovidukt wurde somit ein biologisches Versuchsmodell eingeführt, an dem sich vergleichende Untersuchungen der Alternsvorgänge auf molekularbiologischer Ebene einfach und übersichtlich vornehmen lassen. Es diente in der Folge als Grundlage für zahlreiche weiterführende Studien auf dem Gebiet der molekularen Gerontologie.

7. Literaturverzeichnis

1. ADELMANN, R.C.:
Age-dependent effect in enzyme induction - a biochemical expression of aging.
Exp. Geront. 6, 75 (1971)
2. ADELMANN, R.C., C. FREEMANN, B.S. COHEN:
Enzyme adaptation as a biochemical probe of development and aging.
Adv. Enzyme Regul. 10, 365 (1972)
3. BERGMANN, J.E., G. BRAWERMAN:
Control of breakdown of the polyadenylate sequence in mammalian polyribosomes: role of poly(adenylic acid)-protein interactions.
Biochem. 16, 259 (1977)
4. BOAS, M.A.:
An observation on the value of egg white as the sole source of nitrogen for young growing rats.
Biochem. J. 1, 422 (1924)
5. BOLLUM, F.J.:
Mammalian DNA-polymerases.
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 15, 109 (1975)
6. COMSTOCK, J.P., B.W. O'MALLEY, A.R. MEANS:
Isolation of protein factors from oviduct polysomes which stimulate protein synthesis in vitro.
Fed. Proc. 30, 1209 (1971)
7. COX, R.F.:
Stimulation of protein-bound ribonucleic acid polymerase activity by estradiol in vitro.
Biochem. Soc. Transactions 1, 698 (1973)
8. COX, R.F., M.E. HAINES, N. H. CAREY:
Modification of the template capacity of the chick oviduct chromatin for form-B RNA polymerase by estradiol.
Europ. J. Biochem. 32, 513 (1973)
9. EAKIN, R.E., E.E. SNELL, R.J. WILLIAMS:
Concentration and assay of avidin, injury-producing protein in raw egg white.
J. Biol. Chem. 140, 535 (1941)

10. FRAENKEL-CONRAT, H., J. FRAENKEL-CONRAT:
Metabolic fate of biotin and of avidin-biotin-complex upon parenteral administration.
Arch. Biochem. Biophys. 8, 66 (1952)
11. GREEN, N.M.:
Spectroscopic evidence for the participation of tryptophan residues in the binding of biotin avidin.
Biochem. Biophys. Acta 59, 244 (1962)
12. GREEN, N.M.:
Avidin. 3. The nature of the biotin binding site.
Biochem. J. 89, 599 (1963)
13. JOHNSON, R.C., B. STREHLER:
Loss of genes coding for ribosomal RNA in ageing brain cells.
Nature 240, 412 (1972)
14. KOHLER, P.O.:
Protein synthesis: Differential stimulation of cell-specific proteins in epithelial cells of the chick oviduct.
Science 160, 86 (1968)
15. KOHLER, P.O., P.M. GRIMLEY, B.W. O'MALLEY:
Estrogen induced cytodifferentiation of the ovalbumin secreting gland of the chick oviduct.
J. Cell. Biol. 40, 8 (1969)
16. KORENMANN, S.G., B.W. O'MALLEY:
Avidin assay: A new procedure suitable for tissue fractions.
Biochem. Biophys. Acta 140, 174 (1967)
17. KORENMANN, S.G., B.W. O'MALLEY:
Progesterone action: Regulation of avidin biosynthesis by hen oviduct in vivo and in vitro.
Endocrin. 83, 11 (1968)
18. LJUNGKVIST, H.J.:
Light and electron microscopical study of the effect of estrogen on the chick oviduct.
Acta Endocrin. 56, 391 (1967)
19. MEANS, A.R., J.B. ABRASS, B.W. O'MALLEY:
Protein biosynthesis on chick oviduct polyribosomes.
I. Changes during estrogen-mediated tissue differentiation.
Biochem. 10, 1561 (1971)

20. MEANS, A.R., B.W. O'MALLEY:
Protein biosynthesis on chick oviduct polyribosomes.
II. Regulation by progesterone.
Biochem. 10, 1570 (1971)
21. MEANS, A.R., B.W. O'MALLEY:
Assessment of sex steroid action in vitro.
Act. Endocrin. Suppl. 153, 318 (1971)
22. MÜLLER, W.E.G., A. TOTSUKA, I. NUSSER, J. OBERMEIER,
H.J. ROHDE, R.K. ZAHN:
Poly(adenosine diphosphate-ribose)polymerase in quail
oviduct. Changes during estrogene and progesterone induction.
Nucleid Acids Res. 1, 1317 (1974)
23. MÜLLER, W.E.G., A. TOTSUKA, R.K. ZAHN:
Association of an estradiol receptor with the DNA-dependent
RNA polymerase I from immature quail oviduct.
Biochem. Biophys. Acta 366, 224 (1974)
24. MÜLLER, W.E.G., H.J. ROHDE, R.K. ZAHN, J. LÖHR:
Altersabhängige Avidin-Induktion: Änderungen auf dem
"Transskriptionsniveau".
Act. Geront. 2, 625 (1975)
25. MÜLLER, W.E.G., K. Walter, A. TOTSUKA, R.K. ZAHN:
Abhängigkeit der Avidin-Induktion im Wachtelovidukt vom Alter.
Act. Geront. 2, 59 (1975)
26. MÜLLER, W.E.G., A. TOTSUKA, M. KROLL, I. NUSSER, R.K. ZAHN:
Poly(A)polymerase in quail oviduct. Changes during estrogen
induction.
Biochem. Biophys. Acta 383, 147 (1975)
27. MÜLLER, W.E.G., H.J. ROHDE, R.K. ZAHN, J. LÖHR:
Altersabhängige Avidin-Induktion: Änderungen auf dem Niveau
der DNA-, RNA- und poly (ADP-Rib)synthetisierenden Enzyme.
In: Alternstheorien (hrsg. v. D. Platt), F.K. Schattauer
Verlag, Stuttgart, 93 (1976)
28. MÜLLER, W.E.G., H.J. ROHDE, R.K. ZAHN, J. LÖHR:
Altersabhängige Avidin-Induktion: IV. Änderungen auf dem
Niveau der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen und der Polyade-
nosin Diphosphoribose Polymerase.
Act. Geront. 6, 469 (1976)
29. MÜLLER, W.E.G.:
Endoribonuclease IV: a poly(A)-specific ribonuclease from
chick oviduct. 1. Purification of the enzyme.
Europ. J. Biochem. 70, 241 (1976)

30. MÜLLER, W.E.G., G. SEIBERT, R. STEFFEN, R.K. ZAHN:
Endoribonuclease IV: 2. Further investigation on the specificity.
Europ. J. Biochem. 70, 249 (1976)
31. MÜLLER, W.E.G., G. SEIBERT, R. BEYER, H.J. BRETER, A. MAIDHOF, R.K. ZAHN:
Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178y cells and on nucleic acid synthesizing enzyme systems.
Cancer Res., 37, 3824 (1977)
32. MÜLLER, W.E.G., H.C. SCHRÖDER, J. ARENDES, R. STEFFEN, R.K. ZAHN:
Alteration of activities of nucleases and polyadenylate polymerase in synchronized mouse L-cells.
Europ. J. Biochem. 76, 531 (1977)
33. MÜLLER, W.E.G., H.C. SCHRÖDER, J. ARENDES, R.K. ZAHN, K. DOSE:
Filter paper technique for assaying nucleotidase.
Molec. Biol. Rep. 3, 331 (1977)
34. MÜLLER, W.E.G., J. ARENDES, R.K. ZAHN, H.C. SCHRÖDER:
Control of enzymatic hydrolysis of polyadenylate segment of messenger RNA: role of polyadenylate-associated proteins.
Europ. J. Biochem. 86, 283 (1978)
35. OKA, T., R.T. SCHIMKE:
Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. I. Antagonistic effect of progesterone on estrogen induced proliferation and differentiation of tubular gland cells.
J. Cell. Biol. 41, 816 (1969)
36. OKA, T., R.T. SCHIMKE:
Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. II. Effect of estrogen and progesterone on tubular gland cell function.
J. Cell. Biol. 43, 123 (1969)
37. O'MALLEY, B.W., W.L. MCGUIRE, J. MEDDLETON:
Structure-function relationship of various steroids relative to induction of a specific protein (avidin).
Endocrin. 81, 677 (1967)
38. O'MALLEY, B.W., W.L. MCGUIRE, S.G. KORENMANN:
Estrogen stimulation of synthesis of specific proteins and RNA-polymerase activity in the immature chick oviduct.
Biochem. Biophys. Acta 145, 204 (1967)

39. O'MALLEY, B.W.:
In vitro hormonal induction of a specific protein (avidin)
in chick oviduct.
Biochem. 6, 2546 (1967)
40. O'MALLEY, B.W., W.L. McGUIRE:
Studies on the mechanism of action of progesterone in regulation of the synthesis of specific protein.
J. Clin. Invest. 47, 654 (1968)
41. O'MALLEY, B.W., W.L. McGUIRE, P.O. KOHLER, S.G. KORENMANN:
Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins.
Rec. Progr. in Horm. Res. 25, 105 (1969)
42. O'MALLEY, B.W., D.O. TOFT, M.R. SHERMAN:
Progesterone-binding components of chick oviduct.
II. Nuclear components.
J. Biol. Chem. 246, 1117 (1971)
43. PALMITER, R.D.:
Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomocoid and lysozyme induction.
J. Biol. Chem. 247, 6450 (1972)
44. SHERMAN, M.R., P.L. CARVOL, B.W. O'MALLEY:
Progesterone-binding components of chick oviduct.
I. Preliminary characterization of cytoplasmatic components.
J. Biol. Chem. 245, 6085 (1970)
45. SOREQ, H., U. NUDEL, R. SALOMON, M. REVEL, U.Z. LITTAUER:
In vitro translation of polyadenylic acid-free rabbit globin messenger-RNA.
J. Molec. Biol. 88, 233 (1974)
46. SPELSBERG, T.C., A.W. STEGGLES, B.W. O'MALLEY:
Progesterone-binding components of chick oviduct.
III. Chromatin acceptor sites.
J. Biol. Chem. 246, 4188 (1971)
47. STEIN, G.S., W.D. PARK, C.L. THRALL, R.J. MANS, J.L. STEIN:
Cell cycle stage-specific transcription of histone genes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 945 (1975)
48. WEINBERG, R.A.:
Nuclear RNA metabolism.
Ann. Rev. Biochem. 42, 329 (1973)

Lebenslauf

3. Juni 1952 geboren in Würzburg als Tochter des Verlags-
kaufmannes Friedrich Walter und seiner Ehefrau
Anne, geb. Bissinger.
- 1959 - 63 Besuch der Volksschule in Stuttgart-Sillenbuch.
- 1963 - 71 Schülerin des Hölderlin-Gymnasiums in Stuttgart
und des Neusprachlichen Gymnasiums in Gemünden
am Main mit abschließendem Abitur.
- 1971 - 73 Biologiestudium in Mainz.
- 1972 - 78 Medizinstudium in Mainz, Innsbruck (1975),
London (1976) und München (ab WS 1976).
- Am 13.6.1978 Staatsexamen in Medizin in München.
- Seit August 1978 Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik
München-Harlaching

